

*Stachybotrys atra*에서 추출한 섬유소분해효소에 관한 연구 (II)

—섬유소분해효소의 부분순화와 이 효소의 활성에 미치는  
온도, pH 및 금속이온의 영향—

김 영 민 · 김 은 수

(연세대학교 생물학과)

Studies on the Cellulolytic Enzymes of *Stachybotrys atra*

—Partial purification of cellulase and effects of temperature, pH and metal ions on the enzyme—

KIM Young Min and Woon Soo KIM

(Department of Biology, Yonsei University)

ABSTRACT

A cellulase fraction (F N-1) purified to about 8-folds was obtained from crude cellulase prepared from the wheat bran culture of *S. atra*. The partial purification of the enzyme was made by DEAE Sephadex and Sephadex column chromatography in conjunction with ammonium sulfate precipitation.

After standing at various pH's for 22 hours at 20°C, F N-1 was most stable at pH 5.0. but when the enzyme fraction was stood for 74 hours, the point of pH stability was raised to around pH 6.0-7.0. After heating at various temperatures for 1 hour, F N-1 was most stable at 20°C. The optimal enzyme activities of F N-1 were seen at pH 6.0 and 50°C. The optimal concentrations of Zn<sup>++</sup> and Ca<sup>++</sup> for the activities of crude cellulase were 6 and 4 mM respectively, but Ca<sup>++</sup> inhibited the enzyme activity at concentrations below 2 mM and above 6 mM. Both Cu<sup>++</sup> and Mn<sup>++</sup> ions inhibited cellulase activities and a complete inactivation of crude cellulase was achieved at concentrations of 5 and 2 mM of ions respectively. When Na-CMC was used as substrate, the Km values of crude cellulase and F N-1 were calculated to be 5×10<sup>-4</sup> and 2×10<sup>-5</sup>mM, and V values 32 and 1.38 mmoles/hour, respectively. The Ki values of Mn<sup>++</sup> for crude cellulase and F N-1 were found to be 8×10<sup>-2</sup> and 3×10<sup>-2</sup> mM while those of Cu<sup>++</sup> were at 2×10<sup>-1</sup> and 1×10<sup>-1</sup> mM respectively. Both Mn<sup>++</sup> and Cu<sup>++</sup> showed competitive inhibition with substrate.

緒 論

본 논문은 *Stachybotrys atra*의 cellulase에 관한 저자들의 연구(金동, 1975)에 대한 속편으로, *S. atra*로 부터 얻은 cellulase의 순화방법을 개량하는 한편 crude cellulase에 대한 금속이온의 영향 및 순화된

cellulase의 물리화학적 성질, 즉 온도, pH, 금속이온 등에 의한 영향을 순화과정에서 규명하였다.

材料 및 方法

1. 재 료

균주는 *Stachybotrys atra* Corda SANK

16373(일본 三共주식회사 발효연구소)을 사용하고, 기질로는 Na-CMC(일본花城산업, 분자량; 약 115,000)와 soluble starch(일본島久산업)를 사용했으며, bovine serum albumin (SIGMA)을 단백질질량의 표준시료로, DEAE Sephadex A-25-120(SIGMA)과 Sephadex G-75-120 (SIGMA)을 효소의 순화를 위한 column chromatography에 사용했다.

## 2. 실험방법

### 1) 효소제조

crude cellulase의 제조는 본인들이 이전에 사용한 방법(金동, 1975)을 사용했다.

### 2) Cellulase 활성의 측정

0.6% Na-CMC 1.0ml, 0.1M acetate buffer (pH5.0) 0.6ml 및 효소액 0.5ml을 섞어 40°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 생성되는 환원당의 양을 Somogyi-Nelson의 방법으로 Beckman Spectrophotometer DB-G로써 540nm에서의 흡광도를 측정함으로써 cellulase의 활성을 결정했다.

### 3) Amylase 활성의 측정

0.6% starch 용액 1.0ml를 사용하여 cellulase 활성 측정법과 동일한 방법으로 측정했다.

### 4) 효소액중의 단백질함량의 측정

Beckman Spectrophotometer DB-G를 사용하여 280nm에서의 bovine serum albumin의 표준흡광도선을 구한 다음, 효소의 흡광도를 280nm에서 측정하여 표준 흡광도선과 비교함으로써 단백질함량을 결정했다.

### 5) 효소의 열에 대한 안정도

각기 다른 온도에서 1시간 동안 가열시킨 효소액 0.5ml씩을 취해 cellulase 활성측정법과 동일한 방법에 의해 각 온도에서의 잔여활성을 비교했다.

### 6) 효소의 활성에 미치는 온도의 영향

cellulase의 활성측정법중 온도조건을 다양하게 하여 생성되는 환원당의 양을 측정, 각 온도에서의 활성을 비교했다.

### 7) 효소의 pH에 대한 안정도

효소액을 20°C에서 여러 pH상태로 일정 시간 방치후, 각기 pH 5.0으로 재조정하여 cellulase의 활성측정법과 동일한 방법에 의해 각 pH에서의 잔여활성을 비교했다.

### 8) 효소의 활성에 미치는 pH의 영향

cellulase의 활성측정법 중 buffer의 pH를 다양하게하여 생성되는 환원당의 양을 측정, 각 pH에서의 활성을 비교했다.

### 9) 효소의 순화

가. DEAE Sephadex Column Chromatography

0.05M acetate buffer(pH5.0)에 용해시킨 crude cellulase 10ml를 동일한 buffer에 의해 평형상태를 이룬 DEAE Sephadex A-25 column(2.0×41cm)에 올려 0.05M, 0.1M, 0.5M, 1M acetate buffer(pH5.0) 및 1M NaCl 용액의 차례로 0.5ml/min의流速(flow rate)으로 한 시험관에 10ml씩 받았다.

나. Sephadex Column Chromatography

DEAE Sephadex A-25 column chromatography에 의해 cellulase의 활성이 나타난 4개의 peak 중 cellulase의 활성이 amylase 보다 큰 F IV peak를 취해(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 70% 포화시킨 다음 4°C에 5시간 방치 후 원심분리(5,000g/20min/8°C)하여 침전물을 0.05M acetate buffer (pH5.0)에 녹여 4ml로 한 다음 이것을 동일한 buffer에 의해 평형상태를 이룬 Sephadex G-75 column(2.0×39cm)에서 동일한 buffer로 0.4ml/min의 유속으로 시험관에 10ml씩 받았다.

다. Sephadex G-75 column chromatography에서 cellulase의 활성단 나타난 F IV-1 peak를 취해 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 70% 포화시켜 4°C에 5시간 방치후 원심분리(5,000g/20min/8°C)한 다음 침전물을 소량의 물에 녹여 순화된 효소액으로 사용했다.

10) 효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향

반응에 사용하는 0.1M acetate buffer (pH5.0)에 Ca<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup> 및 Mn<sup>++</sup>의

염을 여러 농도로 녹인 후, cellulase의 활성 측정법과 동일한 방법에 의해 효소의 활성에 미치는 각 금속이온의 영향을 여러 농도에서 관찰했다.

11) 효소역학

가. Michaelis 상수(Km) 및 최대반응속도(V)

여러 농도의 Na-CMC를 사용, cellulase의 활성 측정법과 동일한 방법에 의해 생성되는 환원당의 양을 측정, Lineweaver-Burk Plot에 의해 Km 및 V값을 결정했다.

나. 저해상수(Ki)의 결정

서로 다른 두 농도의 Na-CMC 용액과 효소의 활성을 저해하는 금속이온이 여러 농도로 포함된 0.1M acetate buffer (pH 5.0)를 사용, cellulase의 활성 측정법과 동일한 방법에 의해 생성되는 환원당의 양을 측정하여 Dixon의 방법에 의해 각 금속이온의 효소에 대한 저해상수를 결정했다.

結 果

1. Crude Cellulase의 성질

1) 효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향

금속이온의 영향이 없을 때의 효소의 활성을 100%로 할 경우 (Fig. 1)은 Ca<sup>++</sup>의 활성 촉진 최적농도는 4mM로 106%의 활성을 나타내고, 2mM 이하 및 6mM 이상에서는 오히려 활성을 억제하고 있음을 보여주고 Zn<sup>++</sup>는 0.1mM 이상이 되면 계속 활성을 촉진시키다가 6mM에서 최적농도가 되어 약 140%의 활성을 보이나 그 이상이 되면 감소현상을 보이다가 8mM 이상이 되면 Ca<sup>++</sup>의 경우와 같이 평형상태를 이루고 있다. 한편 (Fig. 2)에서는 Cu<sup>++</sup>의 경우 0.05mM에서는 약 96%의 활성이 나타나나 5mM에서 거의 불활성화하고, Mn<sup>++</sup>의 경우 0.05mM에서는 88%의 활성이 나타나나 2mM에서 효소의 활성이 완전 억제되고 있음을 보여준다.

2) Michaelis 상수(Km) 및 최대반응속도(V)

(Fig. 3)은 pH 5.0에서 Na-CMC를 기질

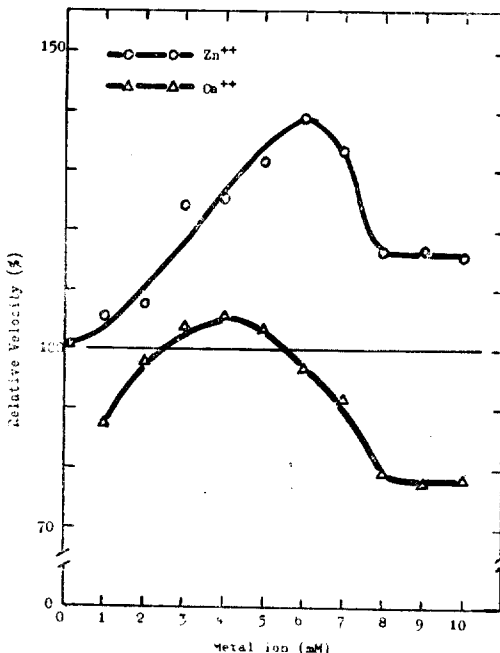


Fig. 1. Effect of Zn<sup>++</sup> and Ca<sup>++</sup> Ions on the Activities of Cellulase.

The crude enzyme activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme, metal ion and Na-CMC for 1 hour/40°C at pH 5.0. The optimal concentrations of Zn<sup>++</sup> and Ca<sup>++</sup> for the unpurified enzyme activity were at 6 and 4 mM respectively.

로 할 경우, crude cellulase의 Km 값이 5×10<sup>-4</sup>mM이며 V값이 1시간당 32mmole임을 나타낸다.

3) 저해상수 (Ki)

pH 5.0에서 3.13×10<sup>-5</sup>mM 및 5.22×10<sup>-5</sup>mM의 Na-CMC를 기질로 할 경우, (Fig. 4)는 Mn<sup>++</sup>의 Ki값이 8×10<sup>-2</sup>mM이며, (Fig. 5)는 Cu<sup>++</sup>의 Ki값이 2×10<sup>-1</sup>mM임을 보여주고 두금속이온이 모두 경쟁적 저해작용을 하고 있음을 나타낸다.

2. Cellulase의 순화

1) DEAE Sephadex Column Chromatography

(Fig. 6)는 효소의 대부분이 pH 5.0의 0.05M acetate buffer (FI)와 1M NaCl (FIV)에 의해 획득되어지며 cellulase의 환

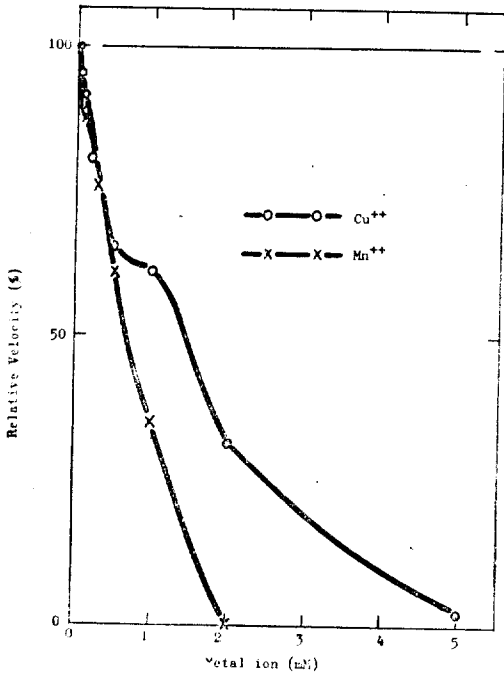


Fig. 2. Effect of Cu<sup>++</sup> and Mn<sup>++</sup> Ions on the Activities of Cellulase.

The unpurified enzyme activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme, metal ion and Na-CMC for 1 hour /40°C at pH 5.0.

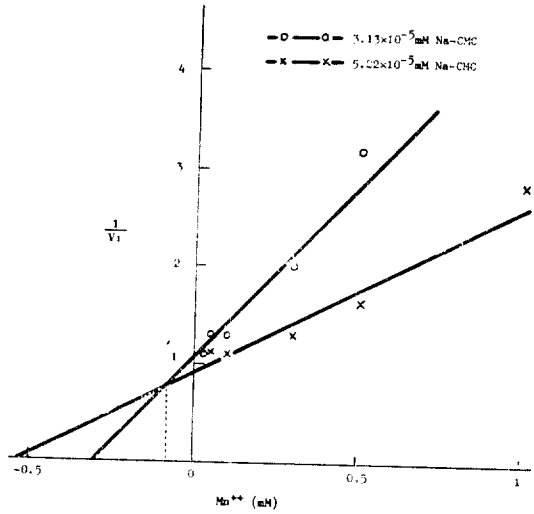


Fig. 4. Plot for the Inhibition Constant of Mn<sup>++</sup> on the Activities of Crude Cellulase. The Ki value was calculated to be 8 x 10<sup>-2</sup> mM.

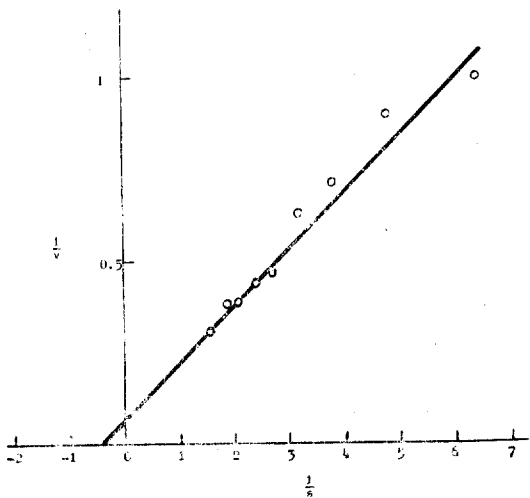


Fig. 3. Lineweaver-Burk Plot of Crude Cellulase.

The values of Km and V were calculated to be 5 x 10<sup>-4</sup> mM and 32 mmoles/hour respectively.

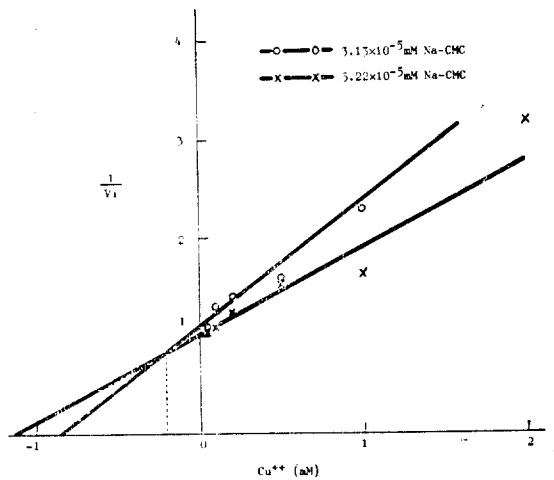
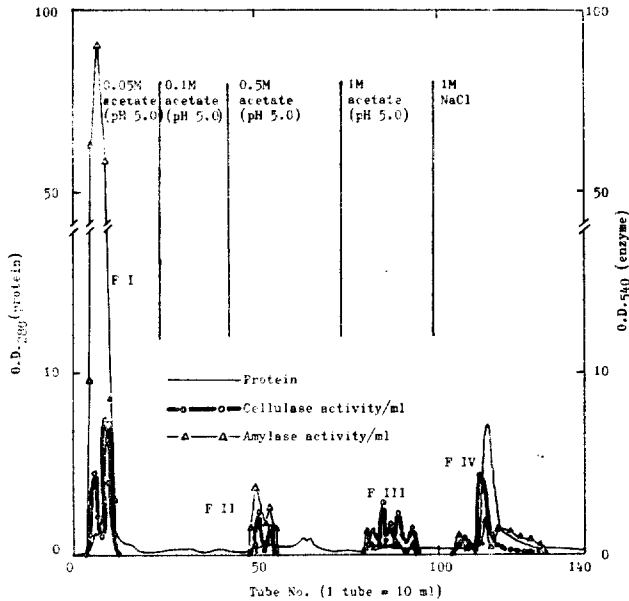


Fig. 5. Plot for the Inhibition Constant of Cu<sup>++</sup> on the Activities of Crude Cellulase. The Ki value was calculated to be 2 x 10<sup>-1</sup> mM.

**Fig. 6.** Chromatogram of Cellulase on DEAE Sephadex A-25 Column.

A 1.0 ml of each fraction was analyzed for the enzyme activity using standard method. Column size; 2.0×41 cm, flow rate; 0.5ml/min.



성도 이곳에서 크게 나타나고, 최소한 4가지의 cellulase가 있음을 시사하고 있다. 또 F I, F II에서는 amylase가, F III, F IV에서는 cellulase가 더 큰 활성을 나타내고 있음을 보여주고 있다.

2) Sephadex Column Chromatography

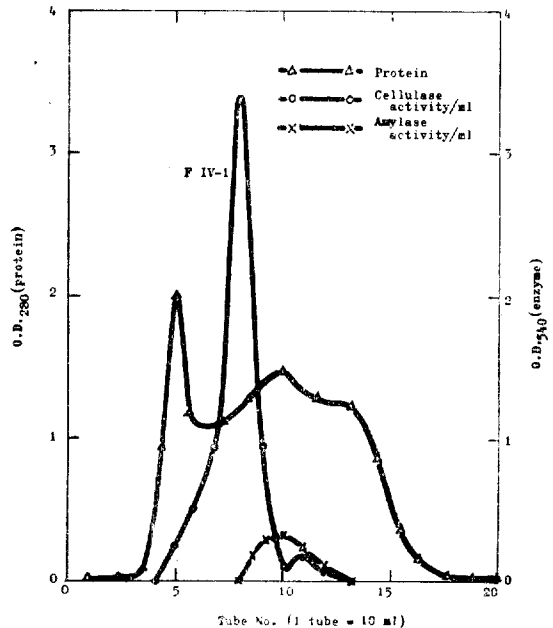
(Fig. 7)은 cellulase의 활성이 amylase보다 큰 F IV의 Sephadex G-75 column chromatography 결과를 나타내는 것으로 F IV-1이 amylase로부터 완전히 분리, 순화되었음을 보여준다.

(Table 1)은 각 순화과정에서 나타난 효소액의 양 및 단백질의 양, 효소의 활성 등을 나타내고 있는데, F IV-1은 crude cellulase에 비해 약 8배 순화되었음을 보여준다.

3. 순화된 Cellulase(F IV-1)의 성질

1) 온도에 대한 안정도

F IV-1의 온도에 대한 안정도는 (Fig. 8)에서와 같이 20°C에서 가장 안정되고 60°C 이상에서는 완전히 불활성화하였다.

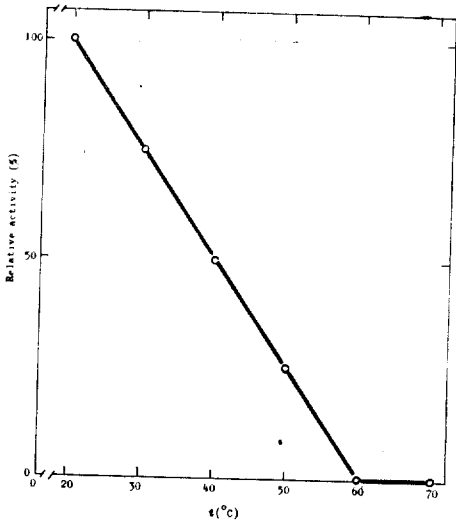


**Fig. 7.** Chromatogram of F IV on Sephadex G-75 Column.

A 1.0 ml of each fraction was analyzed for the enzyme activity using standard method. Column size; 2.0×39 cm, flow rate; 0.4 ml/min

**Table 1.** The Recoveries and Activities of Cellulase during Purification

Purification step	Voulme (ml)	Protein (mg)	Yield (%)	Activity	
				Units	Specific activity (unit/mg)
Crude Cellulase	10	512.91	100	61.82	0.12
DEAE Sephadex A-25					
F I	70	120.90	23.57	86.26	0.71
F II	60	16.09	3.14	19.19	1.19
F III	140	26.60	5.19	61.41	2.31
F IV	80	157.60	30.72	53.93	0.34
Sephadex G-75					
F IV-1	40	30.59	5.96	28.56	0.93



**Fig. 8.** Thermal Stability of the Cellulase Fraction, F IV-1.

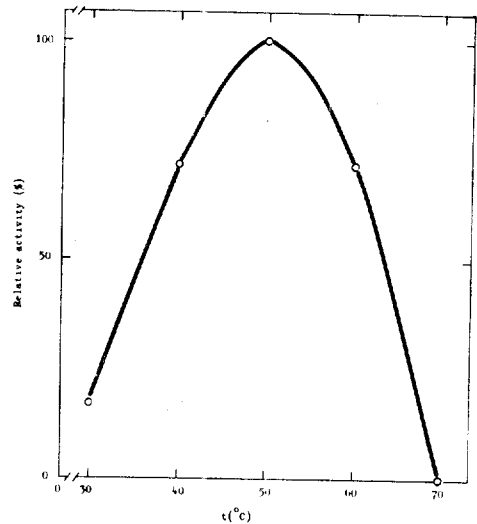
After heating F IV-1 at various temperatures for 1 hour and cooling to room temperature, the residual activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme and Na-CMC for 1 hour/40°C at pH 5.0. The enzyme was most stable at 20°C.

2) 효소의 활성에 미치는 온도의 영향

(Fig. 9)는 FIV-1이 50°C에서 활성이 가장 강하며 70°C 이상에서는 활성이 정지되고 있음을 보여준다.

3) pH에 대한 안정도

(Fig. 10a)는 FIV-1이 22시간 후에는 pH 5.0에서, (Fig. 10b)는 74시간 후에는 pH



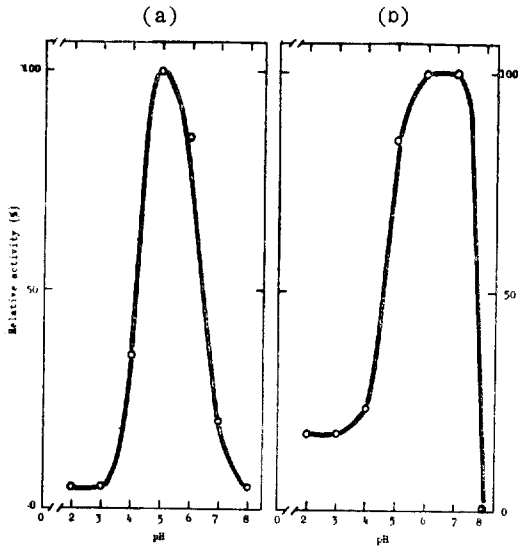
**Fig. 9.** Effect of Temperature on the Activities of F IV-1.

The enzyme activity was determined at pH 5.0 by measuring the reducing power of gulcose after incubation of the mixture of enzyme and Na-CMC for 1 hour at various temperatures. The optimum temperature for the enzyme activity was at 50°C.

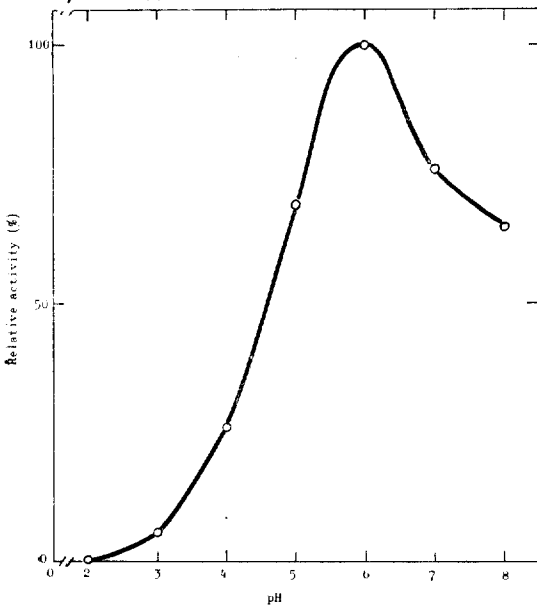
6.0~7.0에서 가장 안정함을 나타내고 있어 시간이 경과함에 따라 산성보다는 중성쪽으로 안정성이 이동되고 있음을 보여준다.

4) 효소의 활성에 미치는 pH의 영향

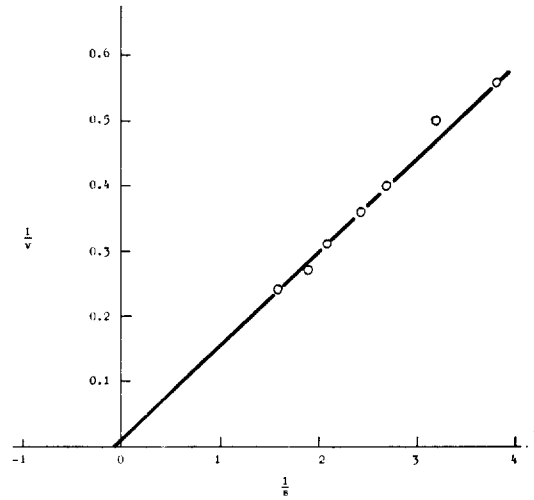
(Fig. 11)은 FIV-1이 pH 6.0에서 가장 강한 활성을 나타내며 산보다는 알칼리쪽에서 더 활발한 작용을 하고 있음을 나타내고 있다.



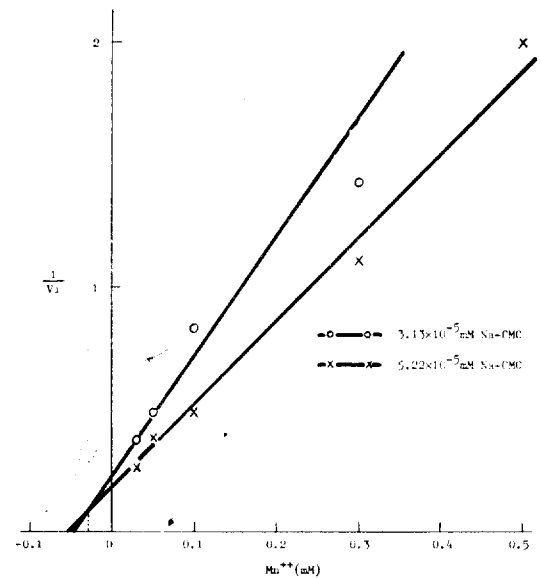
**Fig. 10.** pH Stability of F IV-1. After exposure F IV-1 to various pH's for 22 and 74 hours at 20°C, the enzyme was readjusted to pH 5.0, and the residual activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme and Na-CMC for 1 hour/40°C at pH 5.0. The enzyme was most stable at pH 5.0 after 22 hours and pH 6.0-7.0 after 74 hours. a; after 22 hours, b; after 74 hours



**Fig. 11.** Effect of pH on the Activities of F IV-1. The enzyme activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme and Na-CMC for 1 hour/40°C at various pH's. The optimum pH for the enzyme activity was at pH 6.0



**Fig. 12.** Lineweaver-Burk Plot of F IV-1. The values of  $K_m$  and  $V$  were calculated to be  $2 \times 10^{-5}$  mM and 1.38 mmoles/hour respectively.



**Fig. 13.** Plot for the Inhibition Constant of Mn<sup>++</sup> on the Activities of F IV-1. The  $K_i$  value was calculated to be  $3.2 \times 10^{-2}$  mM.

5) Michaelis 상수(Km) 및 최대반응속도 (V)

(Fig. 12)는 pH 5.0에서 Na-CMC를 기질로 할 경우, FIV-1의 Km 값이  $2 \times 10^{-5}$  mM이며 V 값은 1시간당 1.38mmole임을 나타낸다.

6) 저해상수 (Ki)

pH 5.0에서  $3.13 \times 10^{-5}$  mM 및  $5.22 \times 10^{-5}$  mM의 Na-CMC를 기질로 할 경우, (Fig. 13)은  $Mn^{++}$ 의 Ki 값이  $3 \times 10^{-2}$  mM이며, (Fig. 14)는  $Cu^{++}$ 의 Ki 값이  $1 \times 10^{-1}$  mM임을 나타내고 또한 두 금속이온이 모두 경쟁적 저해작용을 하고 있음을 보여준다.

crude cellulase 보다 약 8배의 specific activity를 가진 cellulase FIV-1을 순화하였다.

FIV-1의 온도에 대한 안정도는 crude cellulase의 30°C(金동, 1975)에 대해서 20°C에서 가장 안정했고 60°C 이상에서는 완전히 불활성화되어 crude cellulase 보다 열처리에 대해 민감한 반응을 나타냈다. 이 결과는 *Aspergillus niger*(Ikeda et. al, 1967)의 순화된 cellulase가 40~50°C에서 안정하고 75~85°C에서 완전히 불활성화되며, *Trichoderma viride*(Okada, 1975)가 30~60°C에서 안정함은 물론 100°C에서도 활성이 남아있다는 사실 및 *Trichoderma koningi*(Iwasaki et. al, 1965)가 40~50°C에서 안정하고 70°C에서 완전 불활성화된다고 한 사실 등과 많은 차이를 나타내고 있다.

또한 기질과의 반응시의 최적온도도 crude cellulase(金동, 1975)와는 달리 50°C였다. 이는 *A. niger*(Ikeda et. al, 1967)의 40°C 및 65°C, *T. viride*(Okada, 1975)의 50°C 및 60°C, *T. koningi*(Iwasaki et. al, 1965)의 55°C와 약간씩 차이를 보이고 있다.

FIV-1의 pH에 대한 안정도는 crude cellulase(金동, 1975)와 달리 22시간 후에 pH 5.0에서 가장 안정했고, 74시간 후에는 pH 6.0~7.0에서 가장 안정되고 pH 8.0에서 급격히 불활성화되어 이 효소가 중성에 가까운 영역에서 안정함을 나타냈다. 이 결과는 *T. koningi*(Iwasaki et. al, 1965)에서 24시간 후에 pH 5.0에서 가장 안정하다는 보고와는 일치하나 *A. niger*(Ikeda et. al, 1967)에서 24시간 후에 pH 4.0~5.0, *T. viride*(Iwasaki et. al, 1965)에서 24시간 후에 pH 5.0~7.0, *A. luchuensis*(Reese et. al, 1950)에서 22시간 후에 pH 4.5~7.0에서 가장 안정하다고 한 보고와는 차이를 나타내고 있다.

기질과의 반응시의 최적 pH는 crude cellulase(金동, 1975)배와 달리 pH 6.0에서 FIV-1의 활성이 강하게 나타나고 있는 바 이는 이 효소가 중성에 가까운 곳에서

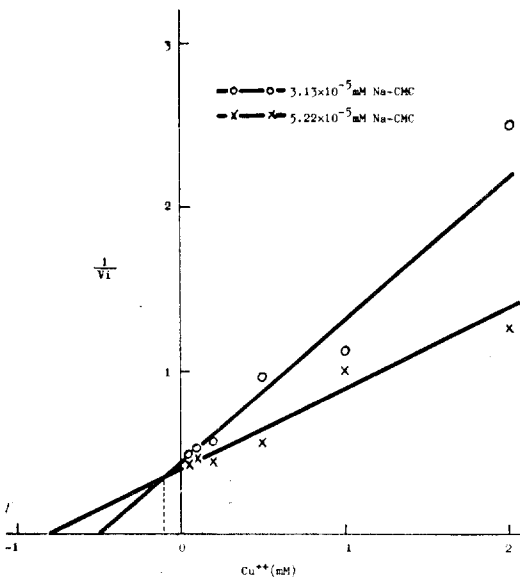


Fig. 14. Plot for the Inhibition Constant of  $Cu^{++}$  on the Activities of FIV-1.

The  $K_i$  value was calculated to be  $1 \times 10^{-1}$  mM.

考 察

Jermyn(1962)이 *Stachybotrys atra*의 cellulase를 순화하는데 사용한 ion-exchange cellulose는 예비실험 결과 cellulase에 의해 환원당으로 전환된다는 사실을 알았기 때문에 본 연구에서는 *S. atra*로부터 추출한 crude cellulase를 보다 안전한 순화방법인 DEAE Sephadex 및 Sephadex Column Chromatography를 사용하여



강한 활성을 보이고 있음을 나타낸다. 이것은 *A. niger*(Ikeda et. al, 1967)의 pH 4.0~5.0 및 2.3~2.5, *T. viride*(Okada, 1975)와 *T. koningi*(Iwasaki et. al, 1965; Wood, 1968)의 pH 4.5~5.0 등 산성 효소들과 상이함은 물론 동일 균주인 *S. atra*(Jermyn, 1955 a,b; Thomas, 1956)의 최적 pH 4.0~5.0 및 6.0~7.0에 비해서 다만 pH 6.0 인접에서 최적인 것은 아마 FIV-1의 보다 높은 순도에 기인할 것이다.

이상의 온도 및 pH가 순화된 cellulase에 미치는 영향이 다양한 것은 cellulase의 다양성에서 기인된 것으로 생각되며 특히 동일 균주인 *S. atra*에서의 결과가 서로 일치하지 않는 것은 배양조건 또는 순화 정도의 상이에서 유래했는지도 모른다. 또 Ikeda 등(1973)이 *A. niger*에서 보고한 acid-cellulase의 최적 pH 2.5와 비교할 때 FIV-1은 중성에 가까운 pH 6.0에서 활성이 강하므로 neutral-cellulase라고 할 수 있겠다.

Crude cellulase에서  $Zn^{++}$ 와  $Ca^{++}$ 는 효소의 활성을 촉진시키고  $Cu^{++}$ 와  $Mn^{++}$ 는 활성을 억제시키고 있으며, 특히  $Zn^{++}$ 는  $Ca^{++}$ 보다 활성 촉진 능력이 더 커서 최적농도 6mM에서 140%의 활성을 보였다.  $Ca^{++}$ 은 3~5mM 농도에서만 활성을 촉진시키고 그 밖에서는 오히려 억제하고 있는 것은  $Ca^{++}$ 의 농도변화에 의해 효소의 활성 중심(active center)이 변화를 일으키는 결과로 보이며, 두 금속이온은 모두 8mM 이상에서는 더 이상 효소의 활성변화에 영향을 미치지 않았다.  $Mn^{++}$  및  $Cu^{++}$ 의 경우는 각각 2mM 및 5mM 농도로서 활성을 완전억제하고 있어  $Mn^{++}$ 의 효과가  $Cu^{++}$ 보다 더 강했다. 이 결과는 *T. viride*(Okada, 1975)와 *T. koningi*(Iwasaki et. al, 1965)에서의 보고와는 일치하나 *A. niger*(Ikeda et. al, 1973)에서 5mM의  $Ca^{++}$  및  $Zn^{++}$ 이 acid

cellulase의 활성을 억제하며, *Poria vaillantii*(Sison et. al, 1958)에서  $Zn^{++}$ 에 의해 활성이 억제되었다는 것, *A. niger*(Clarke와 Stone, 1965)에서 1mM의  $Mn^{++}$ 와  $Cu^{++}$ 가 효소의 활성에 영향을 미치지 않고 10mM의  $Cu^{++}$ 에서 77%의 활성이 남는다고 한 것 등과 상반되고 있다.

FIV-1의 Km값은 Na-CMC를 기질로 했을 때  $2.0 \times 10^{-5}$ mM로  $5 \times 10^{-4}$ mM인 crude cellulase보다 기질에 대한 친화력이 25배나 더 강했다. 이 결과는 Jermyn(1962)이 *S. atra*에서 P-Nitrophenyl  $\beta$ -Glucoside를 기질로 했을 때의 값  $3.2 \times 10^{-5}$ M과 Youatt(1958)가 동일 균주에서 cellobiose 및 P-Nitrophenyl  $\beta$ -Glucoside를 기질로 했을 때의 값  $3.9 \times 10^{-4}$ M 및  $2.0 \times 10^{-4}$ M, Chetkarov와 Kolev(1969)가 *Aspergillus oryzae*에서 Na-CMC를 기질로 했을 때의 값  $3.6 \times 10^{-5}$ M과 비교했을 때 사용한 기질 및 사용균주의 상이함에서 오는 결과의 차이라고도 볼 수 있지만 특히 FIV-1의 Na-CMC에 대한 친화력이 대단히 크다는 것을 알 수 있다.

FIV-1에 대한  $Mn^{++}$ 와  $Cu^{++}$ 의 저해상수(Ki)는 crude cellulase보다 적은  $3 \times 10^{-2}$ mM과  $1.0 \times 10^{-1}$ mM로 순화된 효소가 금속이온의 저해작용에 더 민감했고, Jermyn(1962)이 *S. atra*에서 2-Naphtyl- $\beta$ -Glucoside의 Ki값이  $8.7 \times 10^{-2}$ mM이라고 한 것과 비교할 때  $Mn^{++} > 2$ -Naphtyl- $\beta$ -Glucoside  $> Cu^{++}$ 의 차례로 억제능력이 크다는 것을 알 수 있다. 한편 Jermyn(1955)이 *S. atra*에서  $Hg^{++}$ ,  $Ag^+$ ,  $Tl^{+++}$ 이 불가역적인 저해작용을 한다고 보고한 것과는 달리  $Mn^{++}$ 와  $Cu^{++}$ 는 효소의 활성중심에 대해 Na-CMC와 경쟁적 저해작용을 일으키고 있음을 보여주어 기질의 첨가에 의해 저해작용을 가역적으로 완화 또는 제거시킬 수 있음을 알 수 있다.

## 摘 要

*Stachybotrys atra*를 재료로 하여 cellulase를 분리, 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DEAE Sephadex 및 Sephadex column chromatography를 통해 crude cellulase보다 약 8배로

순화된 FV-1을 얻었다.

2. Crude cellulase의 활성을 촉진하는  $Zn^{++}$ 와  $Ca^{++}$ 의 최적농도는 각각 6mM과 4mM이었고,  $Ca^{++}$ 는 2mM 이하와 6mM 이상에서는 활성을 억제시켰다.

3. Crude cellulase의 활성을 완전억제하는  $Cu^{++}$ 와  $Mn^{++}$ 의 농도는 각각 5mM과 2mM이었다.

4. 여러 온도에서 1시간 동안 가열시, FV-1은 20°C에서 가장 안정하였다.

5. FV-1의 기질과의 반응시의 최적온도는 50°C였다.

6. 여러 pH 상태로 방치시, FV-1은 22시간 후에 pH 5.0, 74시간 후에는 pH 6.0~7.0에서 가장 안정했고 그 이상에서는 급격히 불활성화되었다.

7. FV-1의 기질과의 반응시의 최적 pH는 6.0이었다.

8. Na-CMC를 기질로 했을 때, crude cellulase와 FV-1의 Km 값은 각각  $5 \times 10^{-4}$ mM과  $2 \times 10^{-5}$ mM이며 V 값은 각각 1시간당 32mmole 및 1.38mmole이었다.

9. Crude cellulase와 FV-1에 대한  $Mn^{++}$ 의 Ki 값은 각각  $8 \times 10^{-2}$ mM과  $3 \times 10^{-2}$ mM이고,  $Cu^{++}$ 의 Ki 값은 각각  $2 \times 10^{-1}$ mM과  $1 \times 10^{-1}$ mM이었으며,  $Mn^{++}$ 와  $Cu^{++}$ 가 다같이 경쟁적 저해작용을 하였다.

### 謝 辭

본 연구를 수행하는데 있어 많은 실험재료를 제공하여 주신 동아제약주식회사에 감사드립니다.

### 引 用 文 獻

1. Chetkarov, M., and D. Kolev, 1969. Viscometric determination of the Michaelis-Menten constant of  $\beta$ -1,4-glucan-4-glucanohydrolase (E.C. 3.2.1.4) [Cx-Cellulase Enzyme] *Mcnatsh. Chem.* **100**(3), 986.
2. Clarke, A.E., and B. A. Stone, 1965. Properties of a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Glucan Hydrolase from *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* **96**, 802.
3. Ikeda, R., T. Yamamoto, and M. Funatsu, 1967. Purification and some properties of cellulase from *Aspergillus niger*. *Agri. Biol. Chem.* **31**(10), 1201.
4. Ikeda, R., T. Yamamoto, and M. Funatsu, 1973. Chemical and enzymatic properties of acid-cellulase produced by *Aspergillus niger*. *Agri. Biol. Chem.* **37**(5), 1169.
5. Iwasaki, T., K. Hayashi, and M. Funatsu, 1965. Biochemical studies on cellulase I. Purification and characterization of two types of cellulase from *Trichoderma koningi*. *J. Biochem.* **57**(4), 467.
6. Iwasaki, T., R. Ikeda, K. Hayashi, and M. Funatsu, 1965. Biochemical studies on cellulase. II. Properties of two types of cellulase from *Trichoderma koningi*. *J. Biochem.* **57**(4), 478.
7. Jermyn, M.A., 1955. Fungal cellulases. V. Enzymic properties of *Stachybotrys atra*  $\beta$ -glucosidase. *Aust. J. Biol. Sci.* **8**(4), 563.
8. Jermyn, M.A., 1955. Fungal cellulases. VI. Substrate and inhibitor specificity of the  $\beta$ -glucosidase of *Stachybotrys atra*. *Aust. J. Biol. Sci.* **8**(4), 577.
9. Jermyn, M.A., 1962. Fungal cellulases. X. Further purification of the  $\beta$ -glucosidase of *Stachybotrys atra*. *Aust. J. Biol. Sci.* **15**, 769.
10. Nelson, N., 1944. A Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375.
11. Okada, G., 1975. Enzymic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*. II. purification and properties of two cellulases. *J. Biochem.* **77**, 33.
12. Reese, E.T., R.G.H. Siu, and H.S. Levinson, 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* **59**, 485.
13. Sison, B.C., Jr., W.J. Schubert, and F.F. Nord, 1958. On the mechanism of enzyme action. LXV. A cellulolytic enzyme from the mold *Poria vaillantii*. *Arch. Biochem.*

- Biophys.* **75**, 260.
14. Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19.
15. Thomas, R., 1956. Fungal cellulases. VII. *Stachybotrys atra*: production and properties of the cellulolytic enzyme. *Aust. J. Biol. Sci.* **9**, 159.
16. Wood, T.M., 1968. Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*. Separation of components attacking native cotton. *Biochem. J.* **109**, 217.
17. Youatt, G., 1958. Fungal cellulases. IX. Growth of *Stachybotrys atra* on cellulose and production of a  $\beta$ -glucosidase hydrolysing cellobiose. *Aust. J. Biol. Sci.* **11**, 209.
18. 김은수, 김영민, 강영희, 최태주, 1975. *Stachybotrys atra*에서 추출한 섬유소분해효소에 관한 연구 (I). —효소의 활성에 미치는 온도와 pH의 영향—. 한국미생물학회지 **13**, 59.